【公報種別】特許法第１７条の２の規定による補正の掲載
【部門区分】第３部門第２区分
【発行日】平成20年5月1日(2008.5.1)

【公開番号】特開2002-338598(P2002-338598A)
【公開日】平成14年11月27日(2002.11.27)
【出願番号】特願2001-145874(P2001-145874)
【国際特許分類】
Ｃ０７Ｋ　14/435　(2006.01)
Ｃ０７Ｋ　 1/18　(2006.01)
Ｇ０１Ｎ　30/26　(2006.01)
Ｇ０１Ｎ　30/88　(2006.01)
Ｇ０１Ｎ　33/02　(2006.01)
Ｇ０１Ｎ　33/15　(2006.01)
Ｇ０１Ｎ　27/447　(2006.01)
Ａ２３Ｌ　 1/076　(2006.01)
【ＦＩ】
Ｃ０７Ｋ　14/435
Ｃ０７Ｋ　 1/18
Ｇ０１Ｎ　30/26　A
Ｇ０１Ｎ　30/88　A
Ｇ０１Ｎ　30/88　J
Ｇ０１Ｎ　33/02
Ｇ０１Ｎ　33/15　Z
Ｇ０１Ｎ　27/26　３０１Ａ
Ａ２３Ｌ　 1/076

【手続補正書】
【提出日】平成20年3月12日(2008.3.12)
【手続補正１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】特許請求の範囲
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】　ローヤルゼリー中の下記に示す性質を有する分子量約３５０キロダルトンのタンパク質を指標とする事を特徴とする、ローヤルゼリーの鮮度の評価方法。
１）非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動において単一バンドを形成する。
２）トーソー株式会社製ＴＳＫゲルＧ３０００ＳＷ（7.5×30ｃｍ）をカラムとして用いて、０．３M塩化ナトリウム、０．０５％アジ化ナトリウム含有０．１Mリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）を展開液とし、流速を０．３ｍｌ／ｍｉｎ、カラム温度を３５℃に設定し、２８０ｎｍの吸光度で検出する高速液体クロマトグラフィーにおいて、保持時間１９～２１分にピークを有するタンパク質であり、ゲル濾過法により測定される分子量が約３５０キロダルトンである。
【請求項２】　分子量約３５０キロダルトンのタンパク質が、ローヤルゼリー中総タンパク質量あたりに占める割合が、３５重量％以上であるときに鮮度が良いと評価することを特徴とする、請求項１に記載のローヤルゼリーの鮮度の評価方法。
【手続補正２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０００４

【補正方法】変更
【補正の内容】
【０００４】
一方、ローヤルゼリー中の、
１）非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動において単一バンドを形成する、
２）トーソー株式会社製ＴＳＫゲルＧ３０００ＳＷ（7.5×30ｃｍ）をカラムとして用いて、０．３Ｍ塩化ナトリウム、０．０５％アジ化ナトリウム含有０．１Ｍリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）を展開液とし、流速を０．３ｍｌ／ｍｉｎ、カラム温度を３５℃に設定し、２８０ｎｍの吸光度で検出する高速液体クロマトグラフィーにおいて、保持時間１９～２１分にピークを有し、ゲル濾過法により測定される分子量が約３５０キロダルトンであるタンパク質は、熱に弱く分解し、それに伴いローヤルゼリーの種々の生理活性が低下することは知られていなかった。更に、該タンパク質がローヤルゼリーの鮮度の指標になることも知られていなかった。
【手続補正３】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０００６
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０００６】
【課題の解決手段】
この様な状況に鑑みて、本発明者らは鋭意研究努力を重ねた結果、ローヤルゼリー中の鮮度の指標物質が分子量約３５０キロダルトンタンパク質であり、且つ該タンパク質が分解することによりローヤルゼリーの種々の生理活性が低下することを見出し、発明を完成させるに至った。該タンパク質について、以後、単に「３５０キロダルトンのタンパク質」或いは「分子量３５０キロダルトンタンパク質」と表現することがある。即ち、本発明は、次に示す技術に関するものである。
（１）ローヤルゼリー中の下記に示す性質を有する分子量約３５０キロダルトンのタンパク質を指標とする事を特徴とする、ローヤルゼリーの鮮度の評価方法。
１）ローヤルゼリー中のタンパク質が非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動において単一バンドを形成する。
２）トーソー株式会社製ＴＳＫゲルＧ３０００ＳＷ（7.5×30ｃｍ）をカラムとして用いて、０．３Ｍ塩化ナトリウム、０．０５％アジ化ナトリウム含有０．１Ｍリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）を展開液とし、流速を０．３ｍｌ／ｍｉｎ、カラム温度を３５℃に設定し、２８０ｎｍの吸光度で検出する高速液体クロマトグラフィーにおいて、保持時間１９～２１分にピークを有するタンパク質であり、ゲル濾過法により測定される分子量が約３５０キロダルトンである。
（２）分子量約３５０キロダルトンのタンパク質が、ローヤルゼリー中総タンパク質量あたりに占める割合が、３５重量％以上であるときに鮮度が良いと評価することを特徴とする、（１）に記載のローヤルゼリーの鮮度の評価方法。
以下、本発明について、実施の形態を中心に説明を加える。
【手続補正４】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０００７
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０００７】
【発明の実施の形態】
（１）本発明で使用されるローヤルゼリーの成分である鮮度の指標物質
本発明で使用される鮮度の指標物質は、ローヤルゼリーに含有されていることを特徴とする。ローヤルゼリーの化学的組成は、生産地により、多少の差異はあるが、水分６５～７

０％、タンパク質１５～２０％、炭水化物１０～１５％、脂肪１．７～６％、灰分０．７～２％を含むとされている。ローヤルゼリーの生物学的・薬理学的作用については、老化予防作用、酵素作用、抗菌作用、抗腫瘍作用、血液・循環器に対する作用などが知られている。本発明において特に鮮度が良いと評価されるローヤルゼリーは、分子量約３５０キロダルトンのタンパク質のローヤルゼリー中総タンパク質量あたりに占める割合が、３５重量％以上であることを特徴とする。ローヤルゼリー中のタンパク質は、熱に対して不安定であり、ほとんどのタンパク質が分解する。その中でもこの分子量約３５０キロダルトンのタンパク質は比較的安定に存在するが、高温に曝されると該タンパク質も分解されてくる。該タンパク質が分解される時にはローヤルゼリー中の殆どのタンパク質が分解されており、ローヤルゼリー中の該タンパク質の分解はローヤルゼリーの完全な変性や劣化につながる。また、ローヤルゼリー中での該タンパク質の含有量が減少すると、ローヤルゼリーの種々の生理活性が低下する。ローヤルゼリーの生理活性として、例えば、限界運動量増強作用、肝細胞増殖促進作用、血中アンモニア濃度抑制作用、血中乳酸蓄積抑制作用などの活性を発現することを我々は見出している。ここで、この該タンパク質の含有量であるが、前記効果を十分に発揮する為には、分子量約３５０キロダルトンのタンパク質が、ローヤルゼリー中総タンパク質量あたりに占める割合が、少なくとも３５重量％以上含んでいることが好ましい。このタンパク質はＧＰＣカラムを用いた高速液体クロマトグラフィーによって定量する事ができる。即ち、該タンパク質の多少により、ローヤルゼリーの効果の程度がわかる。更に、ローヤルゼリーを採取直後より、経時的に保存し、この指標物質を定量した場合、この指標物質の含有量は、特に５０℃の高温で単調に減少し、それに伴い、上記したローヤルゼリーの種々の生理活性も同様に減少するため、分子量約３５０キロダルトンのタンパク質はローヤルゼリーの鮮度の指標物質であることがわかる。

【手続補正５】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０００８
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０００８】
（２）高速液体クロマトグラフィーによるローヤルゼリーの鮮度の指標物質の分析
本発明のローヤルゼリー中の分子量約３５０キロダルトンのタンパク質は、高速液体クロマトグラフィーにより特定できることを特徴とする。上記の指標物質は、高速液体クロマトグラフィーによるゲル濾過でも識別・定量することが出来る。従って、この様な分析結果をもって、品質管理や効果の鑑別・評価に使用することもできる。かかるゲル濾過分析は、通常に知られている方法に従って行えば良く、この様な好ましい例としては、例えば、トーソー株式会社製ＴＳＫゲルＧ３０００ＳＷをカラムとして用いて、０．３Ｍ塩化ナトリウム、０．０５％アジ化ナトリウム含有０．１Ｍリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）を展開液とし、流速を０．３ｍｌ／ｍｉｎ、カラム温度を３５℃に設定し、２８０ｎｍの吸光度で検出した結果、鮮度の指標タンパク質量を求めることができる。この分析条件下で、上記指標タンパク質は、保持時間１９～２１分にピークとして現れる（電気泳動で検出されるタンパク質との同一性を確認）。また、既知分子量のゲル濾過分析の結果より、上記指標物質の分子量は、約３５０キロダルトンと確定された。

【手続補正６】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０００９
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０００９】
（３）陰イオン交換クロマトグラフィーによるローヤルゼリー中の350キロダルトンタンパク質の指標物質の分離精製
本発明のローヤルゼリー中の分子量約３５０キロダルトンのタンパク質は、陰イオン交換

クロマトグラフィーにより精製することができる。生ローヤルゼリーを蒸留水に溶解し、その後、50mMのリン酸緩衝液（pH6.2）で透析を行う。その溶液は20000×ｇで20分間4℃で遠心分離し、その上清を粗ローヤルゼリータンパク質溶液とした。その粗ローヤルゼリータンパク質溶液をＤＥＡＥ－Ｔｏｙｏｐｅａｒｌ６５０Ｍをカラムとして用いて、50ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ6．2）を展開液Ａ、50ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ6．2）と0.3ＭＮａＣｌを展開液Ｂとしてグラジェントにより、２８０ｎｍの吸光度で検出し、6.0ml／チューブで分画したフラクション70－110に分子量350キロダルトンのタンパク質分画を分離精製することができる。また、既知分子量のゲル濾過分析の結果より、上記タンパク質は、分子量約３５０キロダルトンタンパク質であると確定された（米倉ら、ローヤルゼリーの蛋白質の特徴と機能 ミツバチ科学、第19巻第1号、第15-22頁、1998年）。

【手続補正７】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００１０
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００１０】
（４）電気泳動によるローヤルゼリー中の分子量約３５０キロダルトンのタンパク質の定性方法
本発明のローヤルゼリー中の分子量約３５０キロダルトンのタンパク質は、電気泳動によりタンパク質の構成を分析し、タンパク質を特定することにより分析できる。まず非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動の方法としては、特に限定されないが、好ましい方法としては、水溶性ローヤルゼリータンパク質（3%ローヤルゼリー水溶液（Ｗ／Ｖ））をポリアクリルアミドゲル（１０％均一）にて、電流２０ｍＡで電気泳動し、クマシーブリリアントブルーにより染色して、タンパク質を特定する方法である。上記の条件でローヤルゼリー中のタンパク質の電気泳動を行うと、上記タンパク質は、単一バンドを形成する。この点で、電気泳動により上記タンパク質の分解を調べるには、非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動が好ましい。分子量マーカーとしてＨＭＷマーカーキット：Native PAGE用（ファルマシアバイオテク社）を用いた場合、上記タンパク質の分子量は約３５０キロダルトンであることが分かった。

【手続補正８】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００１２
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００１２】
＜実施例１＞各種保存温度条件下に於けるローヤルゼリーの鮮度の指標である分子量約３５０キロダルトンのタンパク質をトーソー株式会社製ＴＳＫゲルＧ３０００ＳＷをカラムとして用いて、０．３Ｍ塩化ナトリウム、０．０５％アジ化ナトリウム含有０．１Ｍリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）を展開液とし、流速を０．３ｍｌ／ｍｉｎ、カラム温度を３５℃に設定したＧＰＣにより含有率を測定した。即ち、ローヤルゼリーを４℃、２０℃、４０℃及び５０℃に保存し、０日（スタート時の新鮮なローヤルゼリー中の分子量約３５０キロダルトンタンパク質の含有量／ローヤルゼリー中の総タンパク質量（％）），１日後，３日後，５日後，７日後のローヤルゼリー中の分子量約３５０キロダルトンタンパク質の含有量を測定した。表１に示すように、４℃と２０℃における保存では、分子量約３５０キロダルトンタンパク質は、７日後まで安定であった。一方、４０℃保存、７日後で初めて、２８．８％に減少した。５０℃保存では、１～７日後まで、分子量約３５０キロダルトンタンパク質は経時的に減少し２１．８％まで減少した。即ち、この分子量約３５０キロダルトンのタンパク質は、ローヤルゼリーの鮮度の指標物質となりうることがわかる。

【手続補正９】
【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】００１４
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００１４】
＜実施例２＞マウス抗疲労試験を指標として、実施例１の５０℃で経時的に保存したローヤルゼリーの生理活性試験を行った。即ち、実験動物としてｄｄＹマウス、５週齢、雄、１群１０匹を用いた。ローヤルゼリーの投与方法として、ローヤルゼリーの凍結乾燥物を生換算で５％になるように粉餌（ＣＥ－２）に混ぜて２週間自由摂取させた。（計算上の摂取量は５ｇ/Ｋｇ）抗疲労試験として、京大松元式マウス運動量測定流水槽を用いた。水槽の水流量は８Ｌ/分で流し、マウスを遊泳させ、７秒間以上息継ぎが出来なくなった時点を遊泳時間とした。群分けとして、群分けとして、１群はコントロール（通常食）、２群は、新鮮なローヤルゼリー投与群、３群は、５０℃で１日保存したローヤルゼリー投与群、４群は、５０℃で３日保存したローヤルゼリー投与群、５群は５０℃で５日保存したローヤルゼリー投与群、６群は５０℃で７日保存したローヤルゼリー投与群とした。マウスは泳ぎの上手いものと下手なものがおり、下手なものは遊泳を重ねても遊泳時間がほとんど伸びなかった。従って、マウスの選定とし、投与前遊泳時間において４０分以上泳いだものだけを選出し実験に供した。実験のスケジュールとして、まず、マウスを週１回遊泳させた。１週目に予備遊泳させ、２週目に投与前遊泳時間を測定した。４週目に投与開始後２週目の遊泳時間を測定した。結果を平均遊泳時間比（投与前の遊泳時間を１とした場合の投与後の遊泳時間の比を平均したもの。）として表２に示す。これより、ローヤルゼリーの鮮度の指標物質である分子量約３５０キロダルトンのタンパク質の含有量の多いものほど遊泳時間がのびていることがわかる。従って、該タンパク質が抗疲労の生理活性と極めて良好な相関があることが確かめられた。